



(19)

(11) Publication number:

0

Generated Document.

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(21) Application number: **62204183**(51) Int'l. Cl.: **C12N 15/00 C07H 21/04**(22) Application date: **19.08.87**

(30) Priority:

(43) Date of application publication: **21.02.89**

(84) Designated contracting states:

(71) Applicant: **BITAMIN KENKYUSHI**(72) Inventor: **YAGI KUNIO  
KOJIMA NAKAO  
HAGA NOBUYUKI**

(74) Representative:

**(54) PREPARATION OF  
LIPOSOME CONTAINING  
SEALED GENE**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To enable removal of microbial cells with a 0.45μm filter, by adding a polyhydric alcohol at a latter stage of a gene-inclusion process using a reverse- phase evaporation method, thereby efficiently including a DNA in a liposome having a diameter of ≤ 450nm.

**CONSTITUTION:** In the production of a gene-including liposome by a reverse- phase evaporation method, a polyhydric alcohol such as glycerol or ethylene glycol is added at the latter stage of the gene-inclusion process. The liposome suspension obtained by the above process is treated with a Nuclepore filter having an average pore size of 400nm to obtain liposomes composed mainly of those having diameter of 100W400nm. The gene to be included by this process may be a DNA or a recombinant DNA.

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭64-47381

⑫ Int. Cl. 4

C 12 N 15/00  
C 07 H 21/04

識別記号

庁内整理番号

A-8412-4B

⑬ 公開 昭和64年(1989)2月21日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 遺伝子封入りポソームの製法

⑮ 特願 昭62-204183

⑯ 出願 昭62(1987)8月19日

⑰ 発明者 八木 國夫 愛知県名古屋市名東区西里町2-21

⑰ 発明者 小嶋 仲夫 岐阜県多治見市小名田町3-216

⑰ 発明者 芳賀 信幸 岐阜県可児郡御嵩町御嵩138-3

⑰ 出願人 株式会社 ビタミン研 研究所 岐阜県可児郡御嵩町御嵩字平芝2134番地の1

⑰ 代理人 弁理士 佐々木 功

明細書

1. 発明の名称

遺伝子封入りポソームの製法

2. 特許請求の範囲

(1) 逆相蒸発法による遺伝子封入りポソームの製法において、遺伝子封入工程の後段において多価アルコールを添加することを特徴とする、遺伝子封入りポソームの製法。

(2) 多価アルコールがグリセロールであることを特徴とする、特許請求の範囲第1項に記載の遺伝子封入りポソームの製法。

(3) グリセロールの濃度が約5%であることを特徴とする、特許請求の範囲第1または2項に記載の遺伝子封入りポソームの製法。

(4) ポソームを構成する脂質がリン脂質を必須としていることを特徴とする、特許請求の範囲第1-3項のいずれか1つに記載の遺伝子封入りポソームの製法。

(5) リン脂質がホスファチジルコリン、ホスフ

アチジルセリンおよびこれらの混合物から選ばれたものであることを特徴とする、特許請求の範囲第4項に記載の遺伝子封入りポソームの製法。

(6) ポソームを構成する脂質がリン脂質以外にコレステロールを含有しており、その含量が約40モル%であることを特徴とする、特許請求の範囲第4または5項に記載の遺伝子封入りポソームの製法。

(7) 遺伝子がDNAであることを特徴とする、特許請求の範囲第1-6項のいずれか1つに記載の遺伝子封入りポソームの製法。

(8) 遺伝子が組換えDNAであることを特徴とする、特許請求の範囲第1-6項のいずれか1つに記載の遺伝子封入りポソームの製法。

(9) 遺伝子封入工程において、試料がペースト状になるまで回転式蒸発器内の圧力を約480 mmHgに保ち、次いで多価アルコールを添加し、回転式蒸発器内の圧力を約150 mmHgに保って遺伝子の封入を行うことを特徴とする、特許請求の範囲第1-8項のいずれか1つに記載の遺伝子封入りポソーム

の製法。

(10) 逆相蒸発法による遺伝子封入リポソームの製法において、遺伝子封入工程の後段において多価アルコールを添加し、次いで得られたリポソーム懸濁液を平均ポアサイズ400 nmのニュクリオアフィルターにより処理して直徑100-400 nmを主体とするリポソームとなすことを特徴とする、遺伝子封入リポソームの製法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (産業上の利用分野)

本発明は遺伝子封入リポソームの製法に係わり、殊に逆相蒸発法を利用する遺伝子封入リポソームの製法に係わる。

#### (従来の技術)

リポソームは生体膜と基本的に同じ構造を有する脂質二重層膜からなる閉鎖小胞である。近年、特定の遺伝情報を組み込んだプラスミドDNA等をリポソーム内に封入して生体に導入し、標的細胞と融合させることによって遺伝性疾患や悪性腫瘍の治療を行う、いわゆる「遺伝子療法」に関する

-3-

生体にリポソーム殊にDNA、組換えDNA等の遺伝子を封入したリポソームを注入して標的組織の細胞に融合させて遺伝子療法を行うための、遺伝子封入リポソームとしてはその直徑が約100-400 nmであることが望ましい。なぜならばリポソームが肝臓、脾臓等の細網内皮系に捕捉され難くなし、また毛細血管や血液脳関門を通過し易くなすためにはその径が小さな程好ましく、さらに除菌操作を容易にするためには除菌フィルター（ポア径0.45μm）を通過し得るのが好ましいが、一方においてリポソームの外径が100 nm以下であるとその内容積の制限により数1000塩基対のDNAを封入することが困難となるからである。

一方、上記の逆相蒸発法はリポソームの材料となる脂質の種類や混合比を任意に選択でき、細胞への結合性やDNA封入効率を大になすことができるが、直徑が100-400 nmのリポソームへのDNA封入率が低く、またリポソーム形成時における有機溶媒の減圧除去の際に突沸が生じ易い問題点を有している。

技術が発展しつつある。リポソームとしては材料である脂質の種類、その混合比、製法等により多種多様なものが調製されているが、遺伝子例えはDNA封入リポソームの調製法としてはSzokaとPapahadjopoulosにより開発された逆相蒸発法がある（Proc. Natl. Acad. Sci. USA第75巻第4194-4198頁、1978年）。この方法によれば脂質を有機溶媒に溶解させ、この溶液にDNA含有水溶液を添加し、この混合溶液を超音波処理して逆相ミセルの形成を促し、次いで減圧下に有機溶媒を蒸発することによりDNA封入リポソームが形成される。

一方、リポソーム封入物を細胞に移入する場合には、リポソーム構成脂質の種類が細胞へのリポソーム取り込み量に大きな影響をおよぼし、陰性荷電を有するリン脂質の割合が高いと細胞へのリポソームの結合能が増加することが知られ、またリポソームの安定性はコレステロール含量に影響されることが知られている。

(発明が解決しようとする問題点および発明の目的)

-4-

従って、本発明の目的は、逆相蒸発法による遺伝子封入リポソームの製法であって、リポソーム形成時に試料の突沸が生じ難くかつ直徑が約100-400 nmのリポソームにおいても遺伝子封入率を高くなし得る、遺伝子封入リポソームの製法を提供することにある。

(問題点を解決し、目的を達成する手段および作用)

本発明によれば、上記の問題点は、逆相蒸発法による遺伝子封入リポソームの製法において、遺伝子封入工程の後段において多価アルコールを添加することを特徴とする、遺伝子封入リポソームの製法により解決され、上記の目的が達成される。

本発明において用いられる多価アルコールとしてはグリセロール、エチレングリコール、エリトリトール、ソルビトール等であるが、グリセロールが特に好ましい。多価アルコールは水溶液の形で添加され、その濃度としてはグリセロールの場合に5%程度が好ましい。

リポソーム構成材料の脂質としてはホスファチ

ジルコリン、ホスファチジルセリンまたはこれらの両者を主材とし、コレステロールを副材とするものが好ましい。この場合にコレステロールはリポソームの安定化に寄与するものであり、その配合量は40モル%程度までが好ましい。

これらの脂質を溶解させる有機溶媒としてはジエチルエーテル、イソプロピルアルコール等を挙げることができる。

本発明方法により封入される遺伝子はDNAまたは組換えDNAであることができる。

本発明方法を実施する場合について若干具体的に説明すれば、原料脂質の溶液をナス型フラスコに入れ、回転式蒸発器により有機溶媒を減圧除去してフラスコ内壁に脂質薄膜を形成させた後、これをジエチルエーテルなどの有機溶媒で溶解し遺伝子含有水溶液を添加し、超音波処理して試料を乳化させ、ふたたび回転式蒸発器で有機溶媒を減圧除去してリポソーム懸濁液を調製する。本発明方法によれば上記の乳化試料から有機溶媒を減圧除去する段階で多価アルコール例えばグリセロー

-7-

よく用いられているが、本発明による製法で製造した直径400 nm以下のリポソームには少なくとも2万塩基対のDNAまで封入できるので、本発明はプラスミドDNAをリポソームに封入する有力な手段を提供するものである。

#### (実施例等)

次に、実施例、試験例等に関連して本発明をさらに詳細に説明する。

尚、実施例等において用いた原料、試験法等は下記の通りである。

#### (1) DNA MWマーカーVI (商標)

大阪在、株式会社ニッポンジーンより市販のもの。

#### (2) 卵黄ホスファチジルコリン

大阪在、日本精化株式会社より市販のもの。

#### (3) ホスファチジルセリン

アメリカ合衆国、セントルイス在、シグマ社より市販のもの。

#### (4) コレステロール

アメリカ合衆国、セントルイス在、シグマ社よ

ル水溶液が添加されるが、この添加時期としては減圧を2段階で行い、この2段階目の減圧に先立ち添加するのが好ましい。例えば回転式蒸発器の内圧を約480 mmHgに保って有機溶媒を除去し、試料がペースト状を呈した時点で多価アルコール水溶液を添加し、次いで内圧を約150 mmHgに保って以降の有機溶媒除去を行うのである。この場合に形成される遺伝子封入りポソームの直徑分布は200-400 nm領域が最も多く、それ以上のものも存在する。そこで、100-400 nmの直徑を有するものを主体とする遺伝子封入りポソームを得るためにには、リポソーム懸濁液を平均ボアサイズ400 nmのニュクリポアフィルターに通せば良い。

#### (発明の効果)

本発明による遺伝子封入りポソームの製法によれば、直徑400 nm以下のリポソームにDNAが効率よく封入されるので、0.45 μmのフィルターを用いて容易に除菌操作することができ、生体に遺伝子を導入する担体として用いることができる。現在、遺伝子療法では約1万塩基対のプラスミドが

-8-

り市販のもの。

#### (5) リポソームの定量

リポソームの主要構成成分であるホスファチジルコリンおよびコレステロールを、それぞれ大阪在、和光純薬工業株式会社の「リン脂質B-テストワコー」(商標)および「コレステロールC-テストワコー」(商標)を用いて定量。

#### (6) リポソームの直徑の測定

電子顕微鏡を用いてフリーズフラクチャー法により測定。

#### (7) DNAの定量

Anal. Biochem. 第100巻第188-197頁, 1979年に記載の方法に従って定量。

#### 実施例1

DNAを封入したリポソームは以下のようない方法にて製造した。

卵黄ホスファチジルコリン 9 μmol, コレステロール 6 μmolをクロロホルムに溶解してナス型フラスコに入れ、回転式蒸発器を用いクロロホルムを減圧除去してガラス内壁面に脂質薄膜を作り、

水酸化カリウムを入れたデシケータ中で真空乾燥した。これを1.5 mlのジエチルエーテルに溶解した後、0.5 mlの10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)に溶解した40 μgのDNAを加えて、約60秒間超音波処理をした。超音波によって乳化した試料中のジエチルエーテルを回転式蒸発器を用いて約480 mmHgで減圧除去し、ペースト状になったところで0.5 mlの5%グリセロール水溶液を加えて攪はんし、ふたたび回転式蒸発器を用いて約150 mmHgで残余のジエチルエーテルをさらに減圧除去し、リポソーム懸濁液とした。直径が400 nm以下のリポソームを得るためにリポソーム懸濁液を平均ボアサイズ400 nmのニュクリポアフィルター(アメリカ合衆国、ブレザントン在、ニュクリポア社製)に通した。リポソームに封入されなかったDNAはフィコールバク(スウェーデン王国、ウブサラ在、ファルマシア社製)の密度勾配遠心分離法にてリポソームより除去した。

このようにして製造したDNA封入りリポソームの直径を電子顕微鏡を用いてフリーズフラクチャー

法で調べたところ第1図のようになり、平均ボアサイズ400 nmのニュクリポアフィルターを通過した試料に含まれるリポソームの90%以上は直径400 nm以下であることがわかった。

リポソームに封入されたDNA量はビスベンズイミドH33258フルオロクロム(アメリカ合衆国、ラホヤ在、ヘキスト社製)を用いるDNA微量定量法によって測定した。すなわち、約13 μmolの脂質を含むリポソーム懸濁液100 μlに0.1 mg/mlのDNA分解酵素Iを50 μl加えて37°Cで30分間処理することによってリポソームに封入されていないDNAを消化したのち、フェノール/クロロホルム溶液(フェノール:クロロホルム=1:1, 1 mM EDTA, 10 mMトリス塩酸緩衝液,pH 8.0)でリポソームからDNAを抽出した。次に、1.5 μMのビスベンズイミドH33258フルオロクロム水溶液1 mlを加えて冷暗所に10分間放置したのち蛍光分光光度計(東京在、日立製作所製、650-105型)で355 nmで励起し、460 nmの蛍光を測定し、第2図に示す検量線と照合してDNA量を求めた。本発明方法にて製造

-11-

-12-

したリポソームとSzokaとPapahadjopoulosにより開発された方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA第75巻第4194-4198頁, 1987年)にて製造したリポソームのDNA封入率を比較した結果、直径400 nm以下のリポソームに封入されたDNAの割合は、本発明による製法にて製造したリポソームの場合が後者の方で製造したリポソームの場合より約2倍高く19.8%であった。

次に、本発明による製法にて製造した直径400 nm以下のリポソームに封入されたDNA分子の大きさをアガロースゲル電気泳動法によって測定した。DNA MW マーカーVIには74塩基対から約2万塩基対まで11種類のDNA分子が含まれているのでリポソームに封入され得るDNA分子の大きさを検討するのに好都合である。アガロースゲル電気泳動による解析の結果、直径400 nm以下のリポソームにも少なくとも約2万塩基対のDNA分子は封入され得ることがわかった。

#### 実施例2

グリセロールの最適濃度は蛍光物質であるカル

ボキシフルオレセインを用いて決定した。すなわち、DNA溶液の代わりに57.5 μmolのカルボキシフルオレセインを含む0.5 mlのリン酸緩衝生理食塩水を1 μmolの脂質混合液(ホスファチジルコリン:コレステロール=6:4)に加えて超音波処理を行い、有機溶媒の減圧除去によって試料をペースト状にし、これに1%から10%までのグリセロール水溶液を加え、さらに残余の有機溶媒を減圧除去することによってリポソームを製造した。第3図に示すように直径400 nm以下のリポソームに封入されたカルボキシフルオレセインの量は5%グリセロール水溶液で製造したリポソームの場合に最大となった。

#### 参考例1

DNA封入りリポソームをProc. Natl. Acad. Sci. USA 第75巻第4194-4198頁, 1978年に記載の方法に従って製造した。すなわち、ホスファチジルコリン:コレステロールのモル比が6:4の脂質混合液に40 μgのDNA(DNA MW マーカーVI)を加えてリポソームを製造し、平均ボアサイズ400 nmのニュ

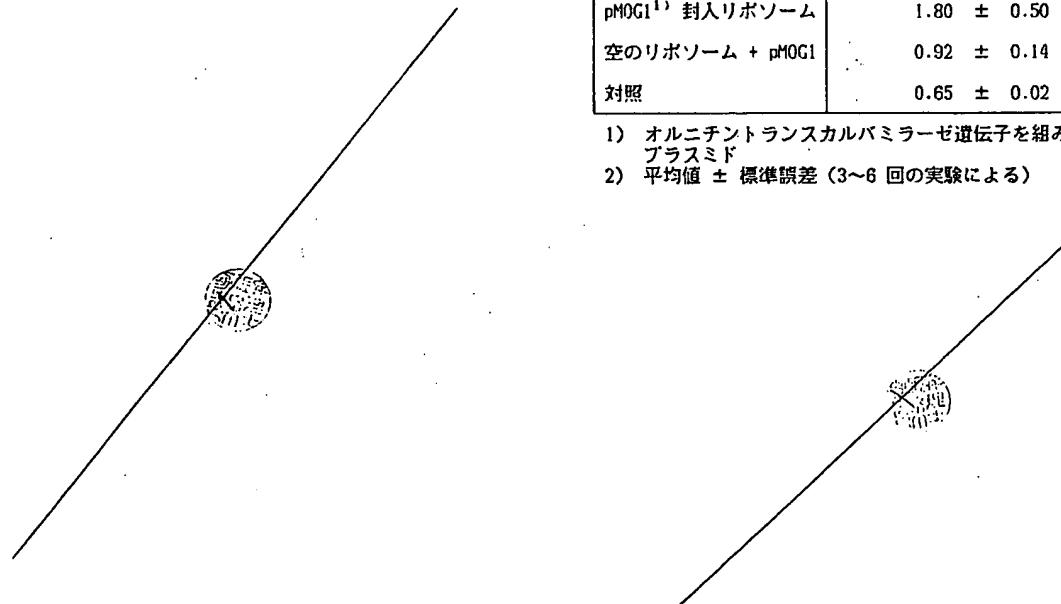
クリポアフィルターを通して直径400 nm以下のリポソームを製造した。このリポソームと本発明による製法で製造したリポソームのDNA封入率をビスペンズイミドH33258フルオロクロムで測定したDNA量から算出し、両者を比較した結果、脂質の回収率、DNAの封入率ともに本発明による製法で製造したリポソームの方が優れていることが判明したが、とりわけ直径400 nm以下のリポソームのDNA封入率は約2倍に増加していた。

#### 参考例2

実施例2記載の製法で製造した148 μmolのカルボキシフルオレセインを封入したリポソームを、約 $1 \times 10^6$ 個のヒト脳腫瘍由来の培養細胞(U178-MG)と接触させ37°Cで1時間静置した後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄して蛍光顕微鏡で観察した。その結果、各細胞はカルボキシフルオレセインを取り込んで強い蛍光を発した。従って、本発明による製法で製造した直径400 nm以下のリポソームは細胞に物質を導入するキャリアーとしての機能を果たし得ることが判明した。

-15-

発明による製法で製造した遺伝子封入りポソームは細胞の中に遺伝子を導入する機能を有することを示している。



#### 試験例

オルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子を組み込んだDNAプラスミド(pMOG1)をリポソームに封入し、ヒト脳腫瘍由来の培養細胞(U178-MG)に接触させオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子が細胞内に取り込まれて発現するかどうかを検討した。

pMOG1封入りリポソームはホスファチジルコリン:ホスファチジルセリン:コレステロール=3:3:4の脂質混合液30 μmolに対して50 μgのプラスミドを用いて、実施例1に記載した方法で製造した。

約 $1 \times 10^6$ 個の細胞に対して500 ngのプラスミドとなるようにpMOG1封入りリポソームを加えて、24時間培養した後、細胞内のオルニチントランスカルバミラーゼの活性を測定した。表に示すように、pMOG1封入りリポソームと接触した細胞のオルニチントランスカルバミラーゼ活性は無処理の細胞の約3倍に、また、リポソームに封入しないpMOG1と接触した細胞の約2倍に上昇した。従って、本

-16-

表

リポソーム	オルニチントランスカルバミラーゼ活性 <sup>2)</sup> (μmol/h/mgタンパク)
pMOG1 <sup>1)</sup> 封入りリポソーム	1.80 ± 0.50
空のリポソーム + pMOG1	0.92 ± 0.14
対照	0.65 ± 0.02

1) オルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド

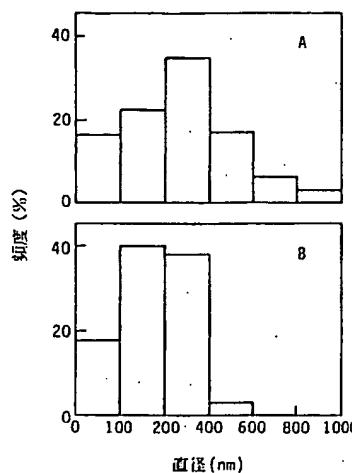
2) 平均値 ± 標準誤差(3~6回の実験による)

## 4. 図面の簡単な説明

第1図はDNA封入リポソームの直径の分布を示すヒストグラムであり、第2図はリポソームに封入されたDNA量をビスピエンズイミドH33258フルオロクロムで測定する時に用いる検量線であり、第3図は各種濃度のグリセロール存在下で製造した各直径のリポソームに封入されたカルボキシフルオレセインの封入率を表すヒストグラムである。

特許出願人 株式会社 ビタミン研究所  
代理人 弁理士 佐々木 功

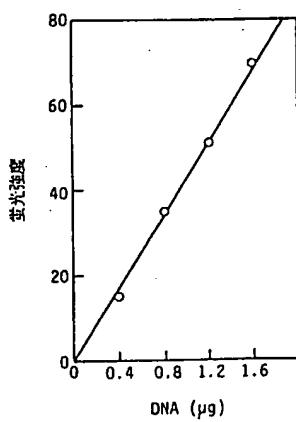
第1図



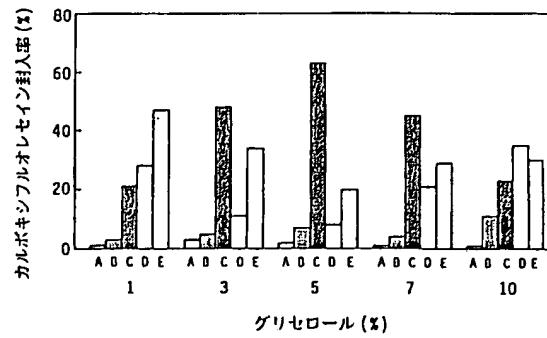
A : ニュクリボアフィルターを  
通す前の DNA封入リポソーム  
B : ニュクリボアフィルターを  
通した DNA封入リポソーム

-19-

第2図



第3図



リポソームの直径、A:<100nm, B:100-200nm, C:200-400nm,  
D:400-800nm, E:>800nm